

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 2 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861352

研究課題名(和文) 7アセチルコリン受容体刺激が筋分化・肥大に及ぼす影響

研究課題名(英文) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 enhances skeletal muscle differentiation and hypertrophy in C2C12.

研究代表者

笹川 智貴 (SASAKAWA, Tomoki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：30400112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：7アセチルコリン受容体は除神経された筋肉や胎児の筋肉で発現が認められている。しかし、筋肉状における7アセチルコリン受容体の生理学的役割は不明である。我々は7アセチルコリン受容体の刺激が筋分化や肥大に影響をあたえると仮定し、C2C12細胞に対して7アセチルコリン受容体刺激薬であるGTS-21を用いてその作用を検討した。分化後6日目にGTS-21投与を受けた細胞の筋管径は増大し、どのようにミオシン重鎖の発現量も増加した。筋管において7アセチルコリン受容体刺激薬GTS-21は筋分化と肥大を促進する。

研究成果の概要(英文)：Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors (α7 nAChRs) have been found in muscle during development and denervation. However, the physiological function of α7 nAChRs in muscle is still unclear. We hypothesized that the α7 nAChRs regulates the differentiation of skeletal muscle cells and investigated the impact of α7 nAChRs on C2C12 murine skeletal muscle cells stimulating with GTS-21, agonist of α7 nAChRs. The diameter of myotubes at day 6 treated with GTS-21 were significantly wider than control group. The expression of MHC was relatively increased in GTS-21 treatment group at day 6. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 enhances skeletal muscle differentiation and hypertrophy in C2C12 myoblasts and myotubes.

研究分野：筋弛緩薬

キーワード：アセチルコリン受容体 神経筋接合部 筋肥大

1. 研究開始当初の背景

(1) 通常²の五つのサブユニットで構成される AChR(成熟型)は終板に最も数多く存在し、神経筋接合部での刺激伝達に関与している。一方で、発生段階の胎児の筋肉や、除神経されて萎縮した筋肉には、通常成人骨格筋には存在しない中枢型 AChR、 γ AChR が発現することが知られている。この異所性に発現した γ AChR は麻酔中に一般的に使用される非脱分極性筋弛緩薬への耐性をもたらす、脱分極性筋弛緩薬による高カリウム血症を増悪させる可能性が示唆されている。しかし実際のところ、このような異所性に発現した中枢型 AChR がどのような生理的意義を持つかについては未だ明らかにはなっていない。中枢神経細胞では γ AChR の刺激が Akt signaling pathway を活性化させる報告がされており、筋肉においても同様の pathway の活性化が期待できる。そこで申請者は γ AChR を元来発現しているマウス骨格筋細胞 C2C12 細胞を使用して、 γ AChR の骨格筋細胞における生理的役割を検討する。

2. 研究の目的

選択的 γ AChR 刺激薬を使用して筋萎縮を予防、治療しうる新しい治療法となるか検討する

(1) 免疫染色法を用いて **γ AChR の局在**を明らかにする。

(3) ウェスタンブロッティングによる筋分化マーカー発現量解析 Giemza 染色法などの手法を用いて **筋分化促進、筋肥大の実際の効果**を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) C2C12 細胞培養系の確立

筋肉細胞のモデルとして、マウスから樹立された C2C12 細胞を実験対象として使用する。37度5%二酸化炭素環下に1%ペニシリン-ストレプトマイシン添加 10%仔牛血清入り Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) にて培養を行う。筋管形成には血清を2%ウマ血清に変更した培地に変更し、6日間培養を行う。

(2) C2C12 細胞における γ AChR の局在確認

γ AChR の発現を C2C12 細胞上で確認した後、その局在性を形態学的に検討する。局在性の検討には抗 γ AChR 抗体を使用して免疫染色を行う。細胞は4%PFA にて固定後、3%BSA にてブロッキングを行う。その後、抗 γ AChR 抗体で一晩反応させた後、翌日蛍光標識した二次抗体を一次抗体と反応させる。共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察を行う。

(3) GTS 21 による γ AChR 刺激

GTS21 (DMXB-A) は γ AChR に特異的に作用する部分アゴニストである。今回の研究では C2C12 細胞を GTS21 を用いて刺激する。DMEM に濃度の異なる GTS21 を加えた培養液を C2C12 に投与する。

筋管分化促進作用の検討

分化した C2C12 細胞は融合し、筋管を形成する。この筋管形成が GTS21 の投与下に促進されるか否かを検討する。分化した筋管はギムザ染色により濃紺色に染まるため、容易に筋芽細胞との区別が可能である。また、撮影した写真をヒストグラム解析することにより、比較的定量評価の困難な染色像を定量的に評価できる。また、と同様にウエスタンブロッティング法により、分化した筋管に多く発現するミオシン重鎖の発現量を比較することによって分化の程度を定量的に評価する。 γ AChR への刺激はタンパク合成を促進し、筋肥大を促進する可能性がある。

筋肥大作用の検討

γ AChR への刺激はタンパク合成を促進し、筋肥大を促進する可能性がある。一般的に筋肥大した筋管はその面積や横径の増加で評価される。と同様にギムザ染色した筋管の面積、横径を ImageJ 上にて比較する。

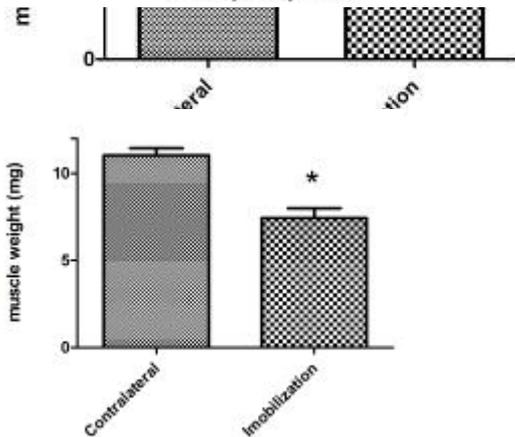
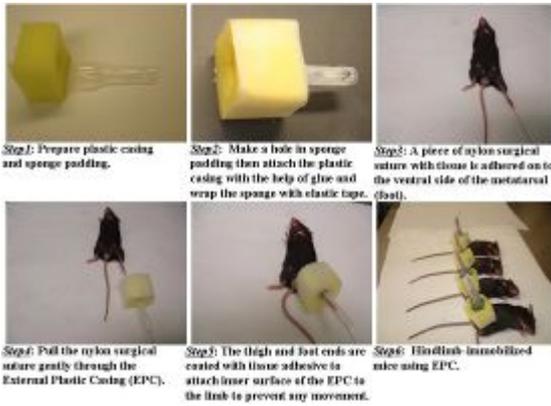
4. 研究成果

(1) GTS 21 を含まない培地での筋管形成 C2C12 は 10%仔牛血清添加 DMEM によって容易に増殖し、90% confluent となった。その状態から24時間毎に2%ウマ血清添加 DMEM に交換された C2C12 は徐々に融合し、培地交換後6日目には筋管を形成した。

(2) (1) で作成した筋管に抗 γ AChR 抗体を用いて免疫染色を施行したが、抗体による特異的反応が得られなかった。そのため別系統の実験として γ AChR を発現していると考えられている下腿不働化モデルをマウスで作成し、アセチルコリン受容体に好感度に反応する蛍光色素 aBTX 複合体を用いて終板上で反応するアセチルコリン受容体の反応する面積で比較することとした。

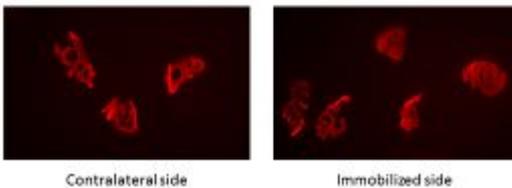
下腿不働化マウスの作成法は以下の Figure にあるように cast を用いた非侵襲的な筋萎縮モデルである。

不働化マウス作成方法



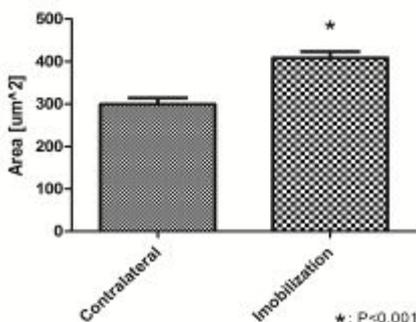
不働化されたヒラメ筋は筋萎縮し、対側と比較して平均 $32.5 \pm 5.3\%$ 減少した。

aBTXを用いて染色された神経筋接合部周辺のアセチルコリン受容体



不働化されたヒラメ筋の神経筋接合部はヒダ状構造がより密になり、染色される面積が増加している傾向が認められた。

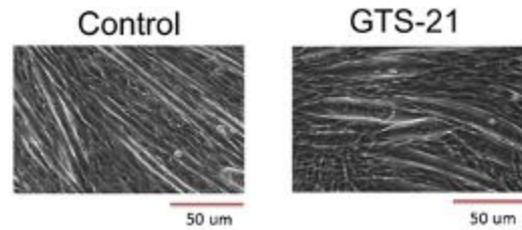
不働化萎縮筋終板面積の変化



不働化されたヒラメ筋の終板面積は 300 ± 15 に対して $408 \pm 15 \mu\text{m}^2$ と増加していた。

(3)

GTS21 を含んだ培地での筋管の変化



1 μM の GTS21 を含んだ培地で培養された筋管は GTS21 を含まない培地で培養された筋管と比較して筋管径が増加する染色像が得られた。

GTS21 が筋管径を増加させる

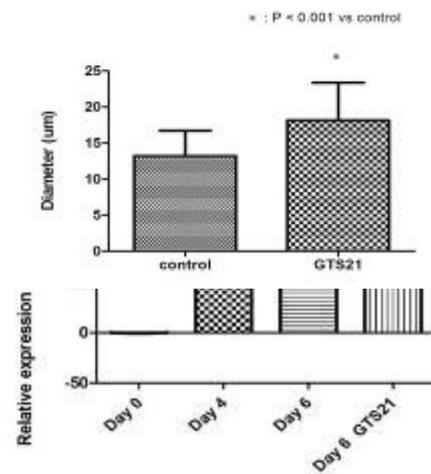
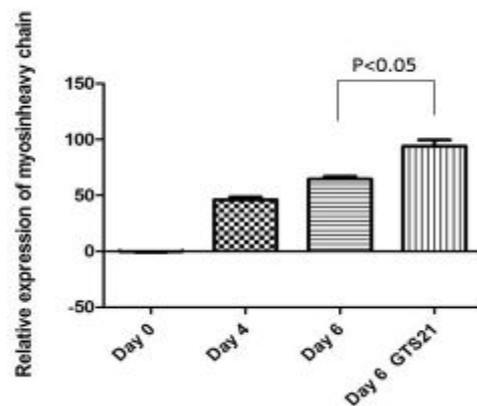


Fig. 3 The diameter of muscle fibers at each day



ミオシン重鎖は 2%ウマ血清を含む培地に変更後、6日目まで徐々に増加した。1 μM の GTS21 を含む培地で培養された細胞では含まない培地と比較してミオシン重鎖の発現量が増加しており、筋管径増加の一因となった可能性が示唆された

<引用文献>

Khan M.A.S, Sahani N, Neville K.A, Nagashima M, Lee S, Sasakawa T, Kaneki M, Martyn J.A.J., Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors, Can J Physiol Pharmacol, 92:1-8. 2014

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

稲垣 泰好、笹川 智貴、Jeevendra Martyn, Immobilization-Induced Atrophy Induces Increased Peri-Junctional Expression of Acetylcholine Receptors in Muscle~ Morphological approach., 米国麻酔学会、2013年10月20日、San Francisco (USA)

笹川 智貴、岩崎 肇、Jeevendra Martyn, The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 enhances skeletal muscle differentiation and hypertrophy in C2C12., 米国麻酔学会、2015年10月19日、San Diego(USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹川 智貴 (SASAKAWA, Tomoki)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：30400112

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

岩崎 肇 (IWASAKI, Hajime)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：00599368

Jeevendra, Martyn (Jeevendra, Martyn)
ハーバード大学・医学部・教授
研究者番号：なし

稲垣 泰好 (INAGAKI, Yasuyoshi)
旭川医科大学・医学部・助教